

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication :
(A n'utiliser que pour
le classement et les
commandes de reproduction).**2.221.122**(21) N° d'enregistrement national :
(A utiliser pour les paiements d'annuités,
les demandes de copies officielles et toutes
autres correspondances avec l'I.N.P.I.)**73.08934**

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

1^{re} PUBLICATION

(22) Date de dépôt 13 mars 1973, à 16 h 30 mn.

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande B.O.P.I. - «Listes» n. 41 du 11-10-1974.

(51) Classification internationale (Int. Cl.) A 61 k 9/00//C 07 c 103/52.

(71) Déposant : Société dite : BAYER AKTIENGESELLSCHAFT, résidant en République Fédérale
d'Allemagne.(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Simonnot, Rinuy, Santarelli.

(54) Nouveaux liposomes contenant des composés chimiques et leur procédé de préparation.

(72) Invention de :

(33) (32) (31) Priorité conventionnelle :

La présente invention concerne la préparation de liposomes ayant un diamètre maximal de 1000 Å, de préférence de 200 à 500 Å. Les parois de ces liposomes sont constituées par des couches mono-, bi- ou multi-moléculaires, 5 mais de préférence par des couches bimoléculaires ayant une épaisseur approximative de 30 à 100 Å. Les substances qui sont utilisées pour la préparation des liposomes, répondent à la formule générale :



10 dans laquelle X est un groupe hydrophile polaire et Y est un groupe hydrophobe non polaire. Par exemple, X désigne un reste phosphate, carboxyle, sulfate, amino, hydroxyle ou choline et Y désigne un reste d'hydrocarbure saturé ou insaturé, par exemple un groupe alkyle, alcényle ou alcynyle, qui peut être substitué le 15 cas échéant, par exemple, par un reste aromatique ou cycloaliphatique.

Toutefois, ceci ne représente que quelques exemples de définitions très avantageuses de X et Y.

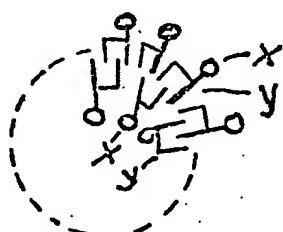
Pour encapsuler des médicaments et des substances 20 analogues, il convient d'utiliser entre autres des phospholipides tels que la lécithine, la phosphatidyléthanolamine, la phosphatidylsérine, l'acide phosphatidique, etc.

Pour préparer des liposomes, il convient d'utiliser principalement deux procédés simples. Dans le premier procédé, 25 on ajoute un lipide à une phase aqueuse et on chauffe légèrement le mélange, puis on l'agit énergiquement par secousses, après quoi on le traite aux ultra-sons jusqu'à ce que les liposomes aient été formés. Leur formation se manifeste par une clarification partielle et l'apparition d'une légère opalescence bleu- 30 âtre.

Dans le second procédé, on prépare un système en dispersion, de préférence un colloïde linéaire, que l'on obtient de la façon la plus simple en transformant en minces pellicules, par évaporation du solvant, une phase dispersée dissoute dans 35 ce solvant, et en faisant ensuite entrer ces pellicules en contact avec une phase continue aqueuse ou non aqueuse, sous

agitation énergique. Le système ainsi produit est ensuite traité aux ultra-sons pendant une période prolongée de temps ; les molécules de la phase dispersée s'orientent alors dans un ordre tout à fait déterminé, dont la structure est reproduite sur le 5 schéma suivant. Ces édifices représentent un état particulièrement favorable du point de vue thermodynamique, en sorte qu'ils ont une grande stabilité et qu'ils peuvent être conservés pendant des mois.

Schéma :



10 X et Y ont les définitions données ci-dessus.

Dans les deux procédés décrits ci-dessus, les liposomes formés peuvent être séparés du mélange réactionnel, par exemple par ultra-centrifugation, chromatographie, etc.

L'application des procédés décrits offre un intérêt 15 particulier pour l'encapsulage de médicaments ou de substances actives cosmétiques, la dimension diamétrale maximale de 1000 Å des liposomes obtenus représentant un progrès important par rapport aux micro-capsules usuelles.

On mentionne ci-après trois propriétés de ces liposomes, en tant que nouvelles formes d'application d'un intérêt 20 particulier pour des substances actives pharmaceutiques ou cosmétiques.

1. Les liposomes formés sont extrêmement stables et peuvent donc protéger les solutions de substances chimiques 25 qu'ils renferment (par exemple des médicaments, des protides, des enzymes, des hormones, des vitamines, etc.) de conditions ambiantes extrêmes ou nuisibles (par exemple pendant le passage dans les voies gastro-intestinales) et ils permettent donc éga-

lement l'administration par voie orale de médicaments sensibles.

2. Les liposomes individuels sont si petits que leur pouvoir de pénétration est extrêmement grand, ce qui permet de leur faire traverser sans difficulté des membranes biologiques.

5 3. Par le choix approprié des substances utilisées pour la préparation des parois des liposomes, on peut influencer les charges exercées à la surface des liposomes et, par conséquent, diriger ces derniers, avec la substance active qu'ils renferment, préférentiellement dans un organe déterminé. Ainsi, par exemple, 10 dans le cas de liposomes renfermant une lécithine et la stéarylamine, le potentiel de surface est positif, tandis que dans le cas de liposomes formés par exemple à partir de phosphatidyl-inositol, le potentiel de surface est négatif.

15 L'application thérapeutique de nombreux médicaments, principalement de protéo-hormones, telles que l'insuline, l'oxytocine, la vasopressine, l'hormone adrénocorticotrope, la calcitonine, la sécrétine, la kallicréine, l'inhibiteur de kallicréine, les relaxine-quinines, le glucagon, ainsi que d'autres médicaments facilement inactivables tels que l'adrénaline, la 20 tubocurarine ou des drogues de résorption difficile telles que la digitaline, notamment la strophantide ou des stéroïdes tels que des oestrogènes ou la testostérone, a été jusqu'à présent limitée aux voies sous-cutanée ou intraveineuse, parce que ces composés sont décomposés dans l'estomac ou dans l'intestin en 25 produits inactifs, ou parce qu'ils ne sont que difficilement résorbés dans l'intestin.

30 Dans tous les cas dans lesquels un tel médicament doit être utilisé en thérapeutique régulièrement pendant des années, une administration par voie orale signifie un grand progrès. La présente invention permet de préparer une forme d'administration des médicaments mentionnés ci-dessus, notamment de l'insuline, que l'on peut faire absorber de façon illimitée par voie orale, les substances actives encapsulées n'étant alors libérées qu'à l'endroit désiré.

35 Dans des tests effectués sur des souris blanches, il a été possible d'engendrer par exemple un choc hypoglycémique par administration orale d'une préparation d'insuline sous la

forme de liposome, avec le double de la dose qui était nécessaire pour engendrer le choc par voie sous-cutanée. Chez des animaux témoins, même avec une dose 20 fois supérieure à la dose habituelle d'insuline, administrée par voie orale, il n'a pas été possible 5 de faire apparaître les symptômes d'une action de l'insuline. Dans un autre test d'activité des nouvelles préparations, on a administré à des souris blanches par voie sous-cutanée la dose usuelle de tubocurarine et par voie orale une dose 3000 fois plus forte. Toutes les souris traitées par voie sous-cutanée sont 10 mortes, tandis que les grandes quantités administrées par voie orale n'ont engendré aucun symptôme. Mais dès que la tubocurarine a été administrée sous la forme incluse dans des liposomes de lécithine, les souris ont pu être tuées avec la quantité sous-cutanée de tubocurarine administrée par voie orale.

15 On a constaté que la quantité utilisée de composé X - Y (lipides) est déterminante pour la préparation de ces liposomes administrables par voie orale et que suivant le type du lipide, elle est optimale dans la gamme de 0,01 à 50 mg par millilitre de solution du médicament.

20 Les liposomes conformes à l'invention conviennent, non seulement comme forme optimale pour des substances actives administrées par voie orale, mais aussi pour de nombreuses autres applications. Ainsi, par exemple, l'excellent pouvoir de pénétration des liposomes permet une application extrêmement efficace de médicaments et de cosmétiques par application sur la peau. Les liposomes pénètrent sans difficulté dans la peau et les tissus, si bien que des substances hydrosolubles peuvent agir à l'endroit désiré, alors que d'habitude, elles ne peuvent pas pénétrer dans la peau.

25 De même, la présente invention permet d'obtenir des préparations de liposomes administrables par inhalation, agissant de façon excellente, et à l'endroit désiré.

Exemple 1

30 Pour encapsuler 300 mg de théophylline, on dissout 35 9 mg de lécithine dans 10 ml de chloroforme et on concentre par évaporation dans un ballon à fond rond, de manière que la lécithine résiduelle soit répartie aussi uniformément que possible

sur la paroi du ballon. Ensuite, la solution de théophilline (300 mg de théophilline dans 3 ml de tampon tris 0,1 M, pH 8,5) est introduite dans le ballon et agitée énergiquement par secousses pendant quelques minutes. Après la formation d'une émulsion blanche, on traite cette émulsion aux ultra-sons pendant une demi-heure. Le système en dispersion se clarifie et la suspension des liposomes formés se présente comme un liquide pratiquement transparent. Les vésicules formées, qui contiennent à présent la solution de théophilline, peuvent être séparées de la lécithine non mobilisée dans la formation de la structure, par ultra-centrifugation pendant une heure à 100 000 g. Pour séparer les liposomes de la solution de théophilline non incluse dans la structure, on procède à une chromatographie sur "Sepharose".

15 Exemple 2

Pour encapsuler 100 mg d'insuline, on dissout 3 mg de phosphatidylinositol dans 10 ml de chloroforme et on concentre la solution par évaporation dans un ballon à fond rond, de manière à former sur toute la paroi intérieure une pellicule uniforme de phosphatidylinositol. Ensuite, on introduit dans le ballon une solution d'insuline (100 mg d'insuline dans 3 ml de tampon de phtalate 0,1 M, pH 4,0) et on effectue ensuite le même traitement que dans l'exemple 1.

Exemple 3

25 On dissout 1 g de trypsine dans 30 ml de tampon au phosphate 0,1 M (pH 7) et on introduit la solution dans un ballon à fond rond de 500 ml, puis on superpose une couche de 15 ml de chloroforme contenant en solution 15 ml de lécithine. Ensuite, on raccorde le ballon à un évaporateur à couche mince et on le fait tourner très rapidement à 30°C pour chasser le chloroforme par évaporation sous pression de 0,1 bar. L'émulsion qui se forme est traitée aux ultra-sons comme dans l'exemple 1, et les liposomes sont ensuite séparés du résidu, également par chromatographie.

35 Exemple 4

On ajoute 4 mg de lécithine par millilitre à une solution de tubocurarine à 0,1 mg/ml et on maintient la solu-

tion à 30°C sous agitation permanente par secousses pendant un certain temps (10 à 20 mn). Ensuite, on traite l'émulsion formée aux ultra-sons pendant 15 à 30 mn, jusqu'à formation d'un colloïde présentant une opalescence bleuâtre, ce qui est un indice de

5 la formation des liposomes. Après ultra-centrifugation pendant 10 mn, au cours de laquelle la matière lipidique non utilisée dans la formation des liposomes se sédimente, on peut séparer les liposomes de la solution non utilisée dans leur formation, par chromatographie sur colonne de "Sephadex" ou de "Sepharose".

10 La suspension de liposomes ainsi obtenue peut être administrée directement par voie orale.

Exemple 5

En procédant comme indiqué dans l'exemple 4, on traite de l'insuline avec de la lécithine très pure pour

15 former une préparation de liposomes pouvant être administrée par voie orale.

REVENDICATIONS

1. Liposomes contenant des composés chimiques, caractérisés par le fait que ces composés sont enveloppés de couches de préférence bimoléculaires, qui sont conformées en liposomes extrêmement petits, de diamètre maximal égal à 1000 Å, ces couches étant formées de substances de formule générale :

X —— Y

dans laquelle X désigne un groupe hydrophile polaire et Y désigne un groupe hydrophobe non polaire.

10 2. Procédé de préparation de liposomes, caractérisé par le fait que les liposomes sont produits par traitement aux ultra-sons, d'un système en dispersion, la phase continue du système contenant à l'état dissous le composé à encapsuler, tandis que la phase dispersée contient la substance formant les 15 liposomes.

15 3. Procédé suivant la revendication 2, caractérisé par le fait que le système traité en dispersion est un système colloidal linéaire que l'on obtient par mise en contact de couches minces de la phase dispersée, sous agitation énergique, 20 avec la phase continue.

4. Procédé suivant l'une des revendications 2 et 3, caractérisé par le fait qu'on utilise des lipides ou des lipoides pour former la phase dispersée.

25 5. Procédé suivant l'une des revendications 2 et 3, caractérisé par le fait qu'on utilise des phospholipides comme phase dispersée.

6. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 2 à 4, caractérisé par le fait qu'il est appliqué à l'encapsulage de médicaments, d'enzymes ou d'insuline.

30 7. Procédé de préparation d'insuline, administrable par voie orale, caractérisé par le fait qu'on inclut l'insuline dans des liposomes qui ont un diamètre maximal de 800 Å, et de préférence de 200 à 500 Å et la matière utilisée pour la réalisation des liposomes consiste en substances de formule générale :

35 X —— Y

dans laquelle X est un groupe hydrophile polaire et Y est un groupe hydrophobe non polaire.

8. Procédé suivant la revendication 7, caractérisé par le fait que les liposomes sont produits par traitement aux 5 ultra-sons d'un système en dispersion, la phase continue du système contenant de l'insuline dissoute, tandis que la phase dispersée contient la matière qui forme les liposomes.
9. Procédé suivant l'une des revendications 7 et 8, caractérisé par le fait que le système traité en dispersion 10 est un colloïde linéaire que l'on obtient par mise en contact de couches minces de la phase dispersée avec la phase continue, sous agitation énergique.
10. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 7 à 9, caractérisé par le fait qu'on utilise des lipides ou 15 des lipoïdes pour la phase dispersée, c'est-à-dire comme matière engendrant les liposomes.
11. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 7 à 9, caractérisé par le fait qu'on utilise des lécithines pour former la phase dispersée.
- 20 12. A titre de produits industriels nouveaux, des liposomes obtenus notamment au moyen d'un procédé suivant l'une quelconque des revendications 2 à 11.
13. Liposomes à base d'insuline, administrables par voie orale, obtenus notamment au moyen d'un procédé suivant 25 l'une quelconque des revendications 7 à 11.



DELPHION

RESEARCH

PRODUCTS

INSIDE DELPHION

[Log Out](#) [Work Files](#) [Saved Searches](#)

My Account

Search: Quick/Number Boolean Advanced Derwent

Derwent Record

[Email this to](#)
View: [Collapse Details](#) [Go to: Delphion Integrated View](#)Tools: [Add to Work File](#) [Create new Work File](#)

Derwent Title:	Encapsulation of chemical substances - in liposomes for medicinal use				
Original Title:	<input checked="" type="checkbox"/> DE2249552A1 : Verfahren zur Inkapsulation von insbesondere wasserloeslichen Verbindungen				
Assignee:	INCHEMA SA Non-standard company BAYER AG Standard company Other publications from BAYER AG (FARB)...				
Inventor:	None				
Accession/Update:	1973-33754U / 197324				
IPC Code:	A61K 9/04 ; A61K 17/02 ; B01J 13/02 ; C07C 103/00 ;				
Derwent Classes:	B05 ;				
Manual Codes:	B04-B01B(Fats, lanolin, lipids) , B05-B01P(P-O(S) bond (cyclo) aliphatic) , B12-M11(Tablets, capsules etc. [general])				
Derwent Abstract:	<p>(DE2249552A) Chemical cpd. - contg. liposomes in which the chemical cpds. are enclosed in a pref. bimolecular layer of substances of formula X-Y (where X is a polar hydrophilic group and Y is a non-polar hydrophobic group) (e.g. phospholipids) to give ultra-small liposomes with a max. dia. of 1000 angstroms are produced by ultrasonic treatment of a disperse system, the closed phase of the system contg. insol. the cpd. which is to be encapsulated and the disperse phase contg. the liposome-forming substance X-Y. The liposomes are extremely stable, affording protection to sensitive medicaments such as proteins, hormones, enzymes, vitamins etc. They are so small that they have outstanding penetration properties, enabling them to be readily pass through biological membranes. By suitable choice of the substance X-Y, the charge properties of the liposome wall can be controlled so that the liposome can be directed to a particular organ. By means of the liposomes, medicaments which have previously only been administered subcutaneously or intravenously can now be administered orally.</p>				
Family:	PDF	Patent	Pub. Date	Derwent Update	Pages Language IPC Code
	<input checked="" type="checkbox"/>	DE2249552A *	197324	German	B01J 13/02
	<input checked="" type="checkbox"/>	ZA7301850A =	197402	English	B29C
		FR2221122A = 1974-11-15	197502	French	A61K 9/00
		JP49118826A = 1974-11-13	197503	English	A61J 3/07
		NL7304133A = 1974-09-25	197441	Dutch	A61K 9/04
	<input checked="" type="checkbox"/>	BE0796610A = 1973-09-12	197350	Dutch	A61K

INPADOC None
 Legal Status:

Claims:

[Hide claims](#)

1. Chemische Verbindungen enthaltende Liposome, dadurch gekennzeichnet, dass diese Verbindungen umhüllt sind von vorzugsweise biomolekularen Schichten, die zu ultrakleinen Liposomen mit einem maximalen Durchmesser von 1000 Å ausgebildet sind, wobei diese Schichten aus Substanzen der allgemeinen Formel: X Y in welcher X eine polare hydrophile Gruppe und Y eine unpolare hydrophobe Gruppe darstellt, bestehen.

Priority Number:

Application Number	Filed	Original Title
CH1971000015453	1971-10-22	

Chemical Indexing Codes:

[M1]01:M423 M431 M782 M902 P620 R000 R031 R032 R033 R034 R036 R038 R043 V400 V406 V600 V611 V621 V622 V624 V751 V752 V753 V754 V795 V800 V901
 [M1]02:B415 B515 B701 B713 B815 B819 B831 G563 H181 H462 H463 H464 H482 H483 H484 H721 J171 J271 J272 J273 L721 L722 M411 M431 M510 M520 M530 M540 M541 M620 M782 M902 R000 R031 R032 R033 R034 R036 R038 R043 V643 V771 V772
 [M1]03:D621 D680 H401 H481 H541 H721 M240 M412 M431 M512 M513 M520 M530 M540 M782 M902 R000 R031 R032 R033 R034 R036 R038 R043 V421
 [M1]04:D932 H212 H213 J522 M412 M431 M511 M520 M530 M540 M782 M902 R000 R031 R032 R033 R034 R036 R038 R043 V460
 [M2]05:E570 G100 H1 H181 H182 H183 H202 H203 H4 H401 H442 H443 H444 H481 H541 H542 L723 L724 M210 M211 M212 M231 M270 M281 M283 M311 M312 M320 M321 M332 M343 M370 M391 M412 M414 M431 M510 M511 M520 M530 M531 M540 M782 M902 R000
 [M2]06:B415 B515 B701 B713 B720 B815 B819 B831 G563 H181 H462 H463 H464 H482 H483 H484 H721 J171 J271 J272 J273 L721 L722 M210 M225 M231 M260 M270 M282 M283 M312 M313 M314 M321 M322 M332 M342 M343 M380 M391 M392 M411 M431 M510 M520 M530 M540 M541 M620 M782 M902 R000 R031 R032 R033 R034 R036 R038 R043
 [M2]07:D621 D680 H4 H401 H481 H5 H541 H7 H721 M126 M132 M210 M231 M240 M270 M281 M311 M321 M332 M340 M343 M370 M391 M412 M431 M512 M513 M520 M530 M540 M782 M902 R000 R031 R032 R033 R034 R036 R038 R043
 [M2]08:D932 H2 H212 H213 J5 J522 M210 M211 M231 M270 M282 M311 M320 M412 M431 M511 M520 M530 M540 M782 M902 R000 R031 R032 R033 R034 R036 R038 R043
 [M5]09:M902 R031 R032 R033 R034 R036 R038 R043 S000 S004 S132 S133 S134 S142 S143 S303 S305 S314 S317 S500 S505 S514 S517 S603 S619 S800 S803 S833 T100 T117 T131 T132 T138 T142 U500 U501

Title Terms:

ENCAPSULATE CHEMICAL SUBSTANCE MEDICINE

[Pricing](#) [Current charges](#)

Derwent Searches:	Boolean	Accession/Number	Advanced
--------------------------	-------------------------	----------------------------------	--------------------------

Data copyright Thomson Derwent 2003

THOMSON

Copyright © 1997-2005 The Thomson Corp

[Subscriptions](#) | [Web Seminars](#) | [Privacy](#) | [Terms & Conditions](#) | [Site Map](#) | [Contact Us](#) | [Help](#)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

BLACK BORDERS

IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

FADED TEXT OR DRAWING

BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

SKEWED/SLANTED IMAGES

COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

GRAY SCALE DOCUMENTS

LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.